



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02295485 A**(43) Date of publication of application: **06.12.90**

(51) Int. Cl. **C12N 15/10**
A61M 1/34
A61M 1/36
G01N 33/50
// C12Q 1/68

(21) Application number: **01115369**(71) Applicant: **NISSHO CORP**(22) Date of filing: **09.05.89**(72) Inventor: **MIYAI KIYOSHI****(54) EXTRACTION OF DNA****(57) Abstract:**

PURPOSE: To extract DNA from high-purity leukocyte with simple procedure in high efficiency by adsorbing and separating leukocyte from blood with a filter packed with fibrous substance having a specific diameter, washing the separated leukocyte to effect deproteinization, freezing the leukocyte together with the filter and thawing at room temperature.

CONSTITUTION: DNA is extracted by conventional process from high-purity leukocyte produced by adding heparin and physiological salt solution to blood,

passing the blood through a filter produced by filling a fibrous substance having an average diameter of $\leq 10\mu\text{m}$ in a vessel to effect the adsorption of the leukocyte to the fibrous substance, washing the leukocyte adsorbed to the filter with a washing liquid composed of 10mM tris[hydroxymethyl]aminoethane and 1mM EDTA to remove proteins such as hemoglobin, freezing the leukocyte together with the filter at a low temperature ($\leq -20^\circ\text{C}$) and thawing the frozen leukocyte at room temperature. The fibrous substance is preferably composed of polyester, polyamide, cotton, polyacrylonitrile, etc.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A) 平2-295485

⑮ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)12月6日

C 12 N 15/10			
A 61 M 1/34	3 1 3	7180-4C	
	3 3 3	7180-4C	
G 01 N 33/50		7055-2G	
// C 12 Q 1/68	P	6807-4B	
	A	8717-4B	
		C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全7頁)

⑭ 発明の名称 DNAの抽出方法

⑯ 特 願 平1-115369

⑰ 出 願 平1(1989)5月9日

⑱ 発 明 者 宮 井 深 大阪府箕面市箕面8丁目7-36

⑲ 出 願 人 株式会社ニッショー 大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号

明 細 書

1. 発明の名称

DNAの抽出方法

2. 特許請求の範囲

1) (ア) 平均直径10 μ m以下の繊維状物質が容器に充填されてなるフィルタを用いて、血液から白血球を吸着分離する。

(イ) 前記フィルタに吸着された白血球を洗浄液で洗浄して、ヘモグロビン等の蛋白質を除去する。

(ウ) 該白血球をマイナス20℃以下の低温でフィルタごと凍結した後、室温で解凍する。

の各工程を含んでなるDNAの抽出方法。

2) 繊維状物質がポリエステル、ポリアミド、縮、またはポリアクリロニトリルからなる請求項1記載のDNAの抽出方法。

3) 洗浄液がTEである請求項2記載のDNAの抽出方法。

出方法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明はサザン・ハイブリダイゼーション(Southern hybridization)などに用いる白血球DNAを抽出するための効率的なDNAの抽出方法に関するものである。

<従来の技術>

近年、遺伝子操作技術の目覚ましい発展により、種々の疾患を遺伝子レベルで解析することが可能になりつつある。たとえば末梢血管から採取された血液の白血球から複雑な方法でゲノムDNAを抽出した後、サザン・ハイブリダイゼーションなどの手法を用いて解析し、遺伝疾患などの診断を行うなどである。

サザン・ハイブリダイゼーション法は、細胞(白血球、リンパ球)からDNAを抽出した後、制限酵素を用いてDNAを切断し、この切断されたDNAを電気泳動した後メンブランフィルタに移し(ブロッティングという)、それからメンブラ

ンフィルタを軽く洗浄した後オープンで乾燥させ、好ましくはフィルタの非特異吸着を減少させる操作を行った後、³²Pで標識した変性ブローブDNAを加えてハイブリダイゼーションを行い、これを洗浄してオートラジオグラフィーでブローイルスDNAや遺伝子の欠損、変異等の多型を検出するものであり、従来、DNAは一般にフィコル法(Ficoll)によって分離された白血球から抽出されていた。

しかしながら、上記フィコル法は、「ヘパリンなどの抗凝固剤を添加した血液に等量のリン酸緩衝食塩液(PBS、PH7.4)を加えて良く混和し、これを分離剤を収容したスピッツ管に静かに注入して、稀釈した血液試料を分離剤の上に重層し、400g30分遠心した後、白血球を含む中間層を掻き乱さぬよう上層を取り除き、さらに上下層を若干含む中間層を採取してこれを別のスピッツ管に採りPBSを加えて混和し洗浄を行い、これを今度は160g10分遠心し、さらに、上清を取り除きPBSを加えて混和し100g10

分遠心するという操作を2回繰り返した後、上清を取り除き必要とする溶媒に浮遊させ、最後に顕微鏡で数を算定し、白血球の数を必要数に調整する。」というものであり、操作が非常に煩雑であり、また操作者の熟練を要するものであった。

<発明の解決しようとする課題>

本発明は如上の事情に鑑みてなされたもので、操作が簡単で、熟練を要せず、かつ効率のよいDNAの抽出方法を提供することを目的とする。

<課題を解決するための手段>

本発明は上記の課題を解決するために、(ア)平均直径10μm以下の繊維状物質が容器に充填されてなるフィルタを用いて、血液から白血球を吸着分離する。(イ)前記フィルタに吸着された白血球を洗浄液で洗浄して、ヘモグロビン等の蛋白質を除去する。(ウ)該白血球をマイナス20℃以下の低温でフィルタごと凍結した後、室温で解凍する。の各工程を含んでなるDNAの抽出方法を採用している。

<作用>

本発明によれば、フィルタに血液を通すと、血液中の白血球は殆ど繊維状物質に吸着され、血液の他の成分と分離される。このフィルタに洗浄液の例えばTE(10mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、1mMEDTA、PH7.6)を通して洗浄すると、ヘモグロビン等の蛋白質が除去される。こうして分離洗浄された白血球をフィルタごと例えば-80℃で凍結した後、室温で放置して白血球を解凍する。それから繊維状物質にTE-mix(TE、10mMNaCl、1.5mMMgCl₂、PH7.5)を加えると、フィルタの繊維状物質に吸着されていた白血球は繊維状物質から容易に回収される。

回収された白血球からゲノムDNAを抽出する操作は、周知の方法で行うことが出来る。

<実施例>

次に本発明の実施例について説明する。

本発明のDNAの抽出方法は、(ア)平均直径10μm以下の繊維状物質が容器に充填されてなるフィルタを用いて、血液から白血球を吸着分離

する。(イ)前記フィルタに吸着された白血球を洗浄液で洗浄して、ヘモグロビン等の蛋白質を除去する。(ウ)該白血球をマイナス20℃以下の低温でフィルタごと凍結した後、室温で解凍する。の各工程を含んでなるものであり、白血球解凍後、フィルタから繊維状物質を取り出し、これにたとえばTE-mixなどの緩衝液を加えて白血球をたとえばスピッツ管など適宜の試験管に回収し、更にこれにたとえば10%硫酸ドデシルナトリウム(SDS)などの界面活性剤と蛋白分解酵素(Proteinase K)を加えて、65℃で15時間インキュベートし、これに熱処理したRNA分解酵素(RNase A)を加えて37℃で1時間インキュベートする。それからこれをフェノール試薬で処理し、DNAをエタノールで沈澱させ精製するものである。蛋白分解酵素を加えるのは、DNAを包んでいる細胞の蛋白質やDNAをつなぎ合わせるための蛋白質(ヒストン等)を分解するためであり、またRNase Aを加えるのは、RNAとDNAの親和力の方がDNAとDNAのそれよ

り大なためにRNAがDNAに混じるとハイブリダイゼーションを行った時にプローブDNAに対する阻害作用を示すことがあるからである。

繊維状物質としては、ポリエステルやポリアミド、綿、ポリアクリルニトリルが使用可能であり、特にポリエステルが白血球回収率が高く好ましい。繊維状物質を充填する容器は、血液を流入させ排出させることのできる開口を有するものであり、たとえば注射器や市販の白血球除去フィルタのケースなどが挙げられる。フィルタに吸着された白血球を洗浄するための洗浄液は、繊維状物質に付着したヘモグロビン等の蛋白質を除去するためのもので、一般にTEが使用される。

白血球の凍結温度は、マイナス2℃以下であり、好ましくはマイナス20℃以下が良く、特にマイナス80℃前後が良い。マイナス80℃前後で急速に冷凍した方が細胞を傷めないで済むからである。尚、室温で放置して解凍するのはフィルタから白血球が剥がれやすくするためであり、解凍後の緩衝液は細胞に害を与えずPHを一定に保つ

る。

(実施例1)

試験管にヘパリン血(血液9.5 mlにヘパリン0.5 mlを加えたもの)を10 ml採り、これに生理食塩水10 mlを加えたものを用意し、これを容量10 mlの注射器に平均直径3.5 μ mのポリエステル繊維80 mg充填してなるフィルタに、ベリスタポンプ(グイアル目盛3)で引きながら流し込み、白血球をポリエステル繊維に吸着させた。次に注射器内の血液を排出して、ポリエステル繊維に付着しているヘモグロビン等の蛋白質をTE 10 ml(4~10 mlの任意量で洗浄できる)で洗浄して除去した。次いで白血球を注射器ごと-80℃で凍結したのち、これを室温で放置して解凍した。それからポリエステル繊維を注射器から取り出し、これにTE-mix 4 mlを加えて白血球を洗い出し回収した。次いで回収された白血球に10% SDS 200 μ l、蛋白分解酵素50 μ l(5 mg/ml)を加え65℃で15時間インキュベートした。そしてさらにこれに熱処理したRNA分解酵素

ものが使用され、一般にTE-mixが使用される。TEの構成要素としてEDTAが加えられているのは、2価の陽イオンをEDTAで吸収することにより、2価の陽イオンと結合し易いDNA分解酵素(DNAase)の反応を阻害するためである。

界面活性剤は白血球を溶解するためのものであり、これを加えると白血球は速やかに溶解して内部のDNAなどが出るため溶液は粘稠になる。界面活性剤は非イオン系のもので生化学的に使用されるものであれば良く、SDSの他にNP-40やトウイーン(Tween)等も使用可能である。白血球の回収には緩衝液と界面活性剤をミックスしたものをを用いても良く、また細胞の溶解には界面活性剤を蛋白分解酵素とミックスして用いても良い。

尚、解凍後の白血球の回収以降の操作については、たとえば雑誌「臨床検査」(vol.32 no.4 1988年4月)の第393頁左欄、第4~37行に紹介された方法など、適宜の方法が選択可能であ

3 ml(10 mg/ml)を加え、37℃で1時間インキュベートし、これをフェノール試薬で処理し、エタノールで白血球を沈澱させDNAを精製した。

第1表は血液をフィルタに通す前と通した後の血液中の白血球の量を測定した結果を示す。約93%の白血球が吸着分離されたことが分かる。

また図1はエタノール沈澱後、蒸留水にDNAを溶解させ吸光度を測定した結果を示す。フィコール・ハイパーク(ファルマシア社製)を用いてDNAを回収(Piccoli法)した時とほぼ同様のパターンを示しており、DNAが回収されていることが分かる。吸光係数は $1 OD = 50 \text{ ng/ml}$ であり、DNAは波長260 nmのところに現れるから、本法を用いた場合のDNAの回収量は33.5 ng/mlであり、Piccoli法を用いた場合(5.6 ng/ml)よりも多い。

(以下余白)

第 1 表

	白血球の数 (個)
吸着前	2700 / μ l
吸着後	200 / μ l

〔実施例2〕

本法により回収された白血球がサザン・ハイブリダイゼーションに使用可能であることを確認するために、本法およびFicoll法を用いて抽出したDNAを制限酵素BglIで消化し、甲状腺刺激ホルモンの β 鎖をコードする遺伝子をプローブ (約500bp) としてハイブリダイゼーションを試みた。その結果得られたオートラジオグラムを第2図および第3図に示す。

本法、Ficoll法ともに、4.4 kb付近に一本のバンドが見られた。このことから、本法を用いて抽出したDNAもFicoll法を用いて抽出したDNAと同様に、実際の分析に使用可能であることが分かる。

回収されたDNAの吸光度を示すグラフであり、図中—○—は本法を用いた場合、—△—はFicoll法を用いた場合である。また、第2図はBglIによって消化されたDNAのパターンを示すオートラジオグラム、第3図は第2図のDおよびEを説明するための図である。

尚、本法で用いたフィルタは実施例1におけるものと同じものである。また、プローブの標識は $\alpha(^{32}\text{P})-\alpha\text{CTP}$ を用い、ニクトランスレーション法を用いた。

<発明の効果>

本発明によれば、次のような効果を奏することが出来る。

(1) 白血球を繊維状物質に吸着分離してこれを洗浄し回収するものなので、操作が簡単であり、また白血球の純度も高い。

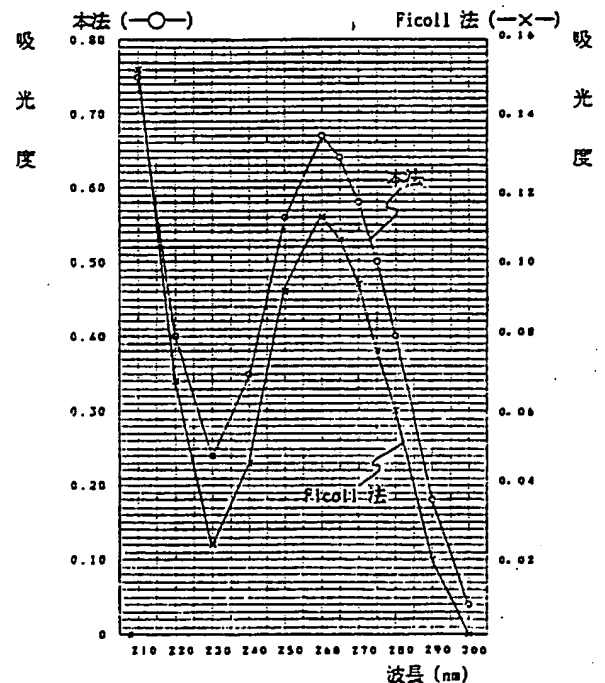
(2) 白血球を凍結後これを室温で解凍しているので、繊維状物質の吸着能が殆ど無くなっており、吸着された白血球の略全量を容易にかつ効率的に回収することが出来る。

(3) 純度の高い白血球を容易にしかも効率良く回収することができるので、DNAの抽出も容易かつ効率的に行うことができる。

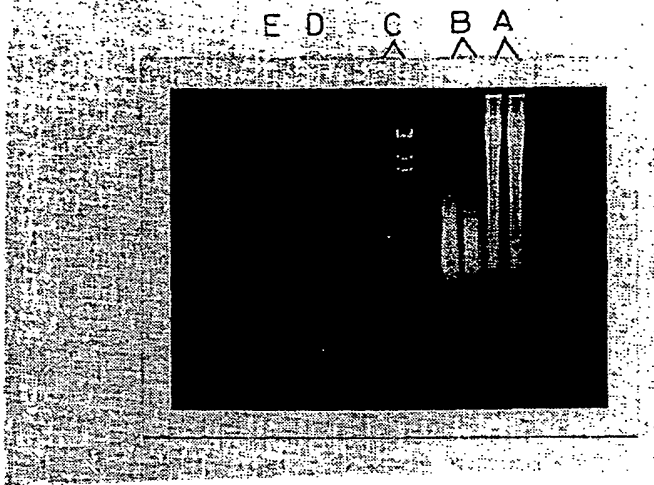
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法とFicoll法により

第 1 図



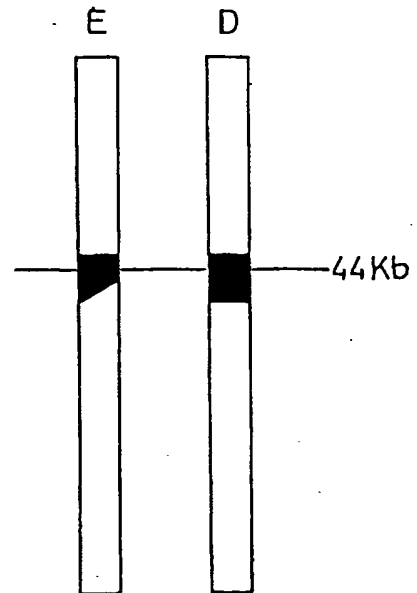
第 2 図



A : Ficoll法
B : 本法
C : マーカー
D : Ficoll法
E : 本法

{ ^{32}P -TSH β プローブによる
ハイブリダイゼーション }

第 3 図



手 続 補 正 書 (方式)

平成 1 年 1 月 23 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第115369号

2. 発明の名称 DNAの抽出方法

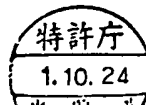
3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
住所(居所) 大阪市北区本庄西3丁目9番3号
氏名(名称) 株式会社ニッショー
代表者 佐 野 賢

4. 補正命令の日付(発送日) 平成 1 年 9 月 26 日

5. 補正の対象 明細書の「発明の詳細な説明」及び
「図面の簡単な説明」の欄、及び
図面の第2図、第3図。

6. 補正の内容 別紙のとおり。



(別 紙)

1. 明細書の第11頁(実施例2)を下記のとおり補正する。

〔実施例2〕

本法およびFicoll法により回収されたDNAを制限酵素BclIで消化し、電気泳動を行ったところ、第2図のようなパターンが得られた。

それぞれのパターンから今回発明した方法がゲノミックサザンに使用できるものであることが推定される。

尚、本法で用いたフィルタは実施例1におけるものと同じである。また、プローブの標識は α (^{32}P)- α CTPを用い、ニクトランスレーション法を用いた。

〔実施例3〕

本法により回収された白血球がサザン・ハイブリダイゼーションに使用可能であることを確認するために、本法およびFicoll法を用いて抽出

BEST AVAILABLE COPY

したDNAを制限酵素BglIで消化し、甲状腺刺激ホルモンのβ鎖をコードする遺伝子をプローブ(約500bp)としてハイブリダイゼーションを試みた。その結果得られたオートラジオグラムを第3図に示す。

本法、Ficoll法ともに、4.4kb付近に一本のバンドが見られた。このことから、本法を用いて抽出したDNAもFicoll法を用いて抽出したDNAと同様に、実際の分析に使用可能であることが分かる。

尚、本法で用いたフィルタは実施例1におけるものと同じものである。

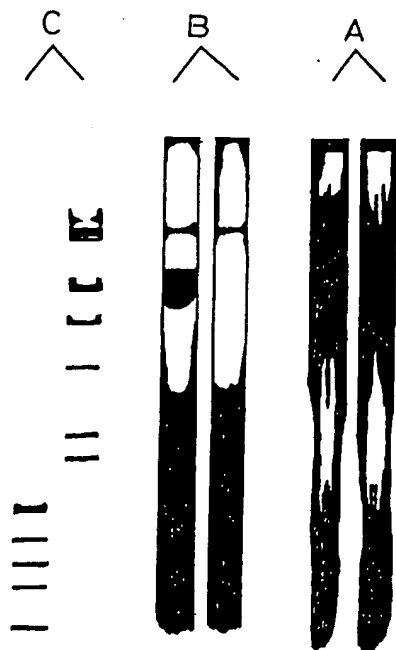
2. 明細書の「図面の簡単な説明」の欄を下記のとおり補正する。

第1図は本発明の方法とFicoll法により回収されたDNAの吸光度を示すグラフであり、図中—○—は本法を用いた場合、—△—はFicoll法を用いた場合である。また、第

2図はBglIによって消化されたDNAのパターンを示す電気泳動図、第3図は第2図で用いたものと同じDNAについて³²P-TSHβプローブでハイブリダイゼーションを行ったときのオートラジオグラムを示す図である。

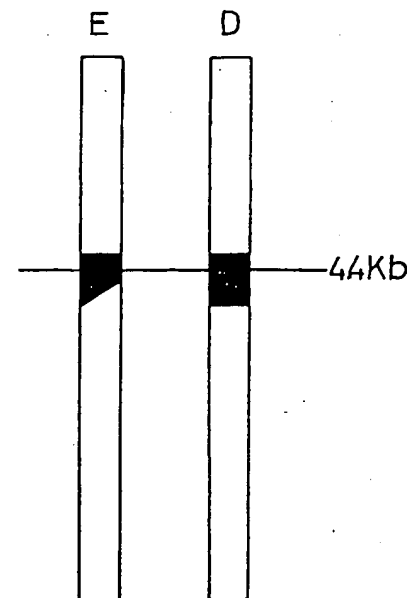
3. 図面の第2図および第3図を別紙のとおり補正する。

第 2 図



A: Ficoll 法
B: 本法
C: マーカー

第 3 図



D: Ficoll 法 { ³²P-TSHβ プローブによる }
E: 本法 { ハイブリダイゼーション }

手続補正書(自発)

(別紙)

平成2年4月10日



[実施例2]

特許庁長官 吉田文毅殿

本法およびFico1法により回収されたDNAを制限酵素B1で消化し、電気泳動を行ったところ、第2図のようなパターンが得られた。

1. 事件の表示 平成1年特許願第115369号
2. 発明の名称 DNAの抽出方法
3. 補正をする者

それぞれのパターンから今回発明した方法がゲノミックサザーンの材料として使用できるものであることが推定される。

事件との関係 特許出願人

尚、本法で用いたフィルタは実施例1におけるものと同様のものである。

住所 大阪市北区本庄西3丁目9番3号

名称 株式会社 ニッショー

代表者 佐野 實



4. 補正命令の日付(自発)
5. 補正の対象 平成1年10月23日提出の手続補正書
6. 補正の内容 手続補正書の別紙の第1頁の[実施例2]を別紙の通り補正する。

方 式 証 (四)

